

# Poxvirus 感染에 있어서의 Virus-宿主細胞의 相互關係

## 1. Cowpox Virus-FL 細胞系의 細胞化學的 Autoradiography 및 細胞免疫學的解析

金 宇 鎬

江原大學 畜産學科

### 緒 論

Virus가 增殖할 경우 그 virus와 宿主細胞의 交涉에 의하여 細胞에는 어떤 變化가 일어날 것이다. 여러가지 virus 感染症에 隨伴하여 核內 혹은 細胞內에 形成되는 封入體는 그 本態가 무엇이던 間에 結果적으로 virus-宿主細胞의 相互關係를 나타내는 形態學的 表現의 하나임에는 틀림이 없다. virus 感染 生體의 組織細胞에서 形成된 封入體는 예전에 그 病理組織學的 診斷價値 때문에 重要視되었으나 大部分의 virus 病의 診斷 내지 virus의 同一性證明에 있어 더욱 適合하고 簡便한 方法이 考案된 現在로서는 그 領域을 벗어나 그것은 오히려 virus의 增殖機構의 解明을 위한 關鍵으로서 注目되게끔 되었다.

더욱히 放射線同位元素의 一種인 tritium (3H)化合物을 使用하는 autoradiography로서의 核酸代謝의 追跡과 免疫細胞學的 術法 즉 螢光抗體法 및 免疫電子顯微鏡法의 同一系實驗으로의 併用은 各各의 特色을 살려 그 威力을 倍加시켜 주므로써 오늘날 virus-宿主細胞의 相互關係를 追究하는 더욱 有力한 研究手段이 되고 있다.

Virus-宿主細胞의 相互關係에 관한 研究는 거이 phage-細菌이라는 가장 單純한 系로 進行되었으며 그것은 代謝, 遺傳策에 관한 生物學的 基本的인 問題의 解明에 크게 貢獻하여 왔다. 이것은 phage-細菌이라는 系가 量的으로 取扱이 容易하며 따라서 生化學的 研究가 容易하였기 때문인 것으로 믿어진다. 動物 virus의 感染病理는 궁극적으로 virus와 動物個體의 相互關係를 밝히는 一連의 過程으로서 phage-細菌系에서는 결코 볼 수 없는 많은 生物學的 現象 특히 形態學的 現象이 發現된다. 그러나 그들 現象에 있어 그 發現機構는 물론, virus 增殖과의 關聯性에 있어서도 그리 많은

것들이 究明되어 있는 것은 아니며 더구나 그와 같은 實驗을 위해서는 莫大한 時間, 勞力 및 經費가 所要된다.

그와 같은 目的의 病理形態學的 現象의 解析에 있어 그 現象의 發現은 細胞水準에서 더욱 迅速하고 容易할 것이므로 本實驗에서는 主로 組織培養細胞系와 封入體 形成으로 두드러진 cowpox virus에 관하여 檢討하였다.

天然痘의 Guarnieri 小體<sup>1)</sup>를 비롯하여 鷄痘의 Bollinger 小體<sup>2)</sup>, ectromelia(鼠痘)의 Marchal 小體<sup>19)</sup> 등, 특히 poxvirus 群은 오래前부터 한 種類의 細胞質內 封入體를 形成한다는 것이 알려져 있었다. 그러나 이와 같은 病理組織學的으로 著明한 現象에도 不拘하고 封入體形成과 virus 增殖과의 關係에 있어서의 意義는 거이 밝혀지지 못하고 있었다. Kato 및 Kamahora<sup>18)</sup>는 어떤 poxvirus의 感染細胞에서는 2種類의 封入體 즉 染色上 同一性格을 갖는 封入體(B型)와 이것外에 2次的으로 全然 別個의 形態學的 性格을 갖는 封入體(A型)가 形成됨을 發表하고 그것의 새로운 分類를 試圖하였다. 또한 封入體가 virus 蛋白과 DNA의 그리고 virus 粒子의 成熟이 이루어지는 場이라는 說을 主張하였고 몇몇 poxvirus와 單純疱疹(HSV)에 의한 封入體 形成의 意義에 關해서 詳細히 報告한바 있다.

本 實驗에서는 cowpox virus-FL 培養細胞系를 使用하여, 感染細胞에서 型成되는 封入體의 性狀 및 virus 增殖에 있어서 그들의 役割에 關하여 細胞化學的 3H-thymidine을 使用한 autoradiography에 의한 DNA 代謝 및 免疫螢光法에 의한 virus 抗原의 追跡으로 virus-宿主細胞의 相互關係를 解析하였으며, 아울러 다른 poxvirus에 있어서의 그와같은 關係를 比較檢討하기 위한 model로 삼고져 하였다.

### 材料 및 方法

組織培養: 細胞는 人羊膜由來 FL 株化細胞(大阪大學

微生物病研究所 保存)를 培養液은 Mininum Essential Medium (MEM) Eagle(大阪大學 微生物病研究會 製品)에 10%로 犢牛血清을 加하여 使用하였다. 最初에 平角培養瓶(16 oz)에 數個로 增殖시킨 다음 3~4日 지나서 coverslip 이 들어있는 Leighton tube 들에 繼代培養하였다. 이때 培養液은 tube 當 3 ml 씩, 細胞는  $5 \times 10^4$ 의 數로 하고 37°C에서 培養, 數日後 coverslip 面에 細胞가 單層으로 發育되면 virus 를 稀釋하여 接種하고 繼續培養하면서 經時的으로 各가지 實驗을 行하였다.

**Virus:** 使用된 virus 는 cowpox virus LB red strain (大阪大學 微生物病研究所 保存)으로 FL 細胞에 繼代培養된 上清液이며, 그 感染力價는  $1.8 \times 10^7$  pfu/ml 로서 大體로  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 로 稀釋하여 Leighton tube 當 0.2 ml 씩 接種하였다.

**細胞化學의 方法:** 經時的으로 細胞變性を 이룬 coverslip 을 꺼내어 PBS 로 洗滌한 다음 固定, 染色을 하여 封入體(A 및 B 型) 形成樣相을 觀察하였다. Giemsa 染色(Kato 變法) 및 May-Greenwald Giemsa (MGG) 染色의 경우는 methanol 로 固定하고 hematoxylin-eosin (H & E) 染色의 경우는 Bouin 液(酸性)으로 固定하였다.

兩型 封入體의 DNA 含有 如否를 보기 위하여 感染細胞 coverslip 을 Carnoy 液으로 固定한 後 Feulgen 反應을 施行하였다.

對照로서 virus 非接種 培養細胞도 같은 方法으로 各 各 染色하여 觀察하였다.

**同位元素 및 Autoradiography:** DNA 前驅物質인 thymidine 에 tritium (3H)을 標識한 3H-thymidine-6-T(第一化學藥品株式會社 製品)을 MEM 으로 稀釋하여  $10 \mu\text{Ci/ml}$ 의 水準으로 使用하였다.

Autoradiography 法은 加藤<sup>28)</sup>가 記述한 dipping film 法에 의거하여 施行하였다. 正當 및 感染細胞 coverslip 이 들어있는 各 Leighton tube 에 2.0 ml 씩의 3H-thymidine 液을 加하여 37°C에서 1時間 恒溫器에서 培養한 다음 coverslip 을 꺼내어 Hanks 液으로 洗滌하였다. Giemsa 後染色을 위해서는 methanol 로, H & E 後染色을 위해서는 Bouin 液으로 固定한 다음 管底에 구멍이 난 小試驗管에 넣어 過鹽素酸(PCA)液으로 事前處理하였다. 다시 暗室에서 autoradiogram 用 感光 emulsion(小西六寫眞材料産業社 製品)에 dipping 한 後 乾燥吸收劑가 들어있는 罐속에 넣어 密閉하고 4°C 冷暗所에서 3~5日間 露出시켰다. 露出시킨 coverslip 들을 다시 暗室에서 現象하고 定着過程을 거치게

한 다음 各各 固定한 것에 따라 Giemsa 또는 H & E 後染色을 하여 黑化銀粒子的 發現과 封入體의 相關關係 즉 DNA 代謝를 追跡하였다.

**免疫細胞學的 況法(螢光抗體法):** 抗體의 螢光標識은 이미 大阪大學 微生物病研究所에서 作成한 抗 cowpox virus 家兔血清을 使用하여  $\text{NaSO}_4$ 로 沈澱, globulin 分割을 얻고, 過陰性荷電 및 未結合色素의 除去를 위하여 DEAE cellulose 및 Sephadex G 25 (Pharmacia Fine Chemicals 製品) column 들을 使用하고 또한 非特異螢光을 際去하기 위하여 臟器 acetone 粉末로 吸收시키는 術法<sup>18, 29, 30)</sup>에 따라 螢光色素인 fluorescein isothiocyanate (FITC) (BBL 製品)을 結合시켜 螢光抗體를 作成하였으며 冷暗所에 保管 使用하였다.

感染細胞에서의 CPE 部位 및 封入體와 virus 抗原과의 相關關係를 밝히기 위하여 coverslip 을 直接法으로 反應시켜 Nikon 螢光顯微鏡을 써서 UV 勵起方式으로 觀察하였다.

**發育鰾卵 漿尿膜에서의 Pock 形成:** 供式 virus 株의 pock 形成에 있어 단순히 出血에 의한 赤色 pock 를 再 確認하기 위하여 發育 12日卵의 漿尿膜(CAM)에 一定稀釋의 cowpox virus (LB red strain)를 接種, 繼續 孵化後 4~5日째에 割卵하여 接種部位를 中心으로 CAM 을 切取, petri dish 의 2% formalin 液에 浸漬 固定하고 平平히 떠서 黑紙를 背景으로 virus 特有的 red pock 形成을 觀察하였다.

## 結 果

**FL 細胞에서의 細胞變性 및 封入體發現:** FL 細胞 單層培養에 cowpox virus (LB red 株)를 接種한 後 15~18時間 經過하여 細胞變性(CPE)을 觀察하였던바 virus 稀釋  $10^{-1}$ 의 것에서는 거의 全面的인 CPE 를 나타내었으며,  $10^{-2}$  및  $10^{-3}$ 稀釋의 것에서는 適切히 散在된 CPE 部位를 보여 주었고  $10^{-4}$ 稀釋의 것에서는 드물게 focus 樣 CPE 를 보여 주므로서 同一時間에서의 CPE 發現의 輕重은 接種 virus 量에 相關됨을 알았다(Fig. 1). 또한 드물게 多核巨細胞의 形成을 볼 수 있었으며 末期에 이룬 培養細胞는 大體로 全般的인 退化性變性を 보여 주었다.

드물게 또는 適切히 CPE 를 나타낸 培養細胞에서의 封入體 形成을 觀察하기 위하여 몇가지 染色法으로 coverslip 을 染色하였다. Merhanol 固定, Giemsa 染色 標本에서는 CPE 部位의 細胞에서 細胞質의 methylene blue 色調와 강한 對照를 이루는 赤紫色, 無定形의

細胞質內 封入體 즉 B型과 그 크기가 작은 圓形의 空胞樣 淡靑色 내지 無色에 가까운 封入體 즉 A型이 散在되어있음을 볼 수 있었다. Virus 接種後 培養時間이 經過됨에 따라 于先의 發現된 B型 封入體(virus 接種 6時間後에 이미 나타났음)에 이어 續發的으로 A型 封入體가 形成되었으며 그 크기 및 數는 培養時間의 經過와 더불어 漸次 增大되었다. B型 封入體도 感染 初期段階에서는 작고 조밀하거나 응결된 集塊로서 細胞核보다도 짙은 赤紫色調를 띠나 感染時間의 經過와 더불어 그 크기가 커지는 傾向을 보이며 그 內部도 漸次 顆粒狀, 網狀을 呈하게 되고 마침내 細胞質內에 擴散된 狀態의 것으로 觀察되었다(Fig. 2).

한편 Bouin 液 固定, hematoxylin (H & E) 染色 標本에서 B型 封入體는 hematoxylin 色調에 eosin 色調가 加味된듯한 침침한 色調를 나타내며 初期段階의 조밀할때는 細胞核의 色調와 그리고 末期의 확산되었을 때는 細胞質의 色調에 類似하나 封入體周圍에 鮮명한 halo를 形成하므로서 明瞭히 識別될 수 있었다. 이 경우 A型 封入體도 halo로 周圍를 둘러싸고 同質性的 鮮명한 紅色이 걸드린 eosin 色調의 圓形으로 나타났다 (Fig. 3).

May-Greenwald Giemsa (MGG) 染色 標本에서는 A型 封入體는 均質의 靑色調를 띠었으며 B型 封入體는 더욱 紫色이 加味된 赤色을 띠었으나 Giemsa 染色에 비해 두드러진 特色을 나타내지 못 하였다.

酸性固定, H & E 染色에서는 封入體 周圍가 halo로 둘러싸이므로 더욱 識別이 容易하여 훌륭한 方法인 것으로 생각되었으나 B型 封入體는 末期에 diffuse하게 細胞質內에 擴散되어 있거나 A型 封入體의 發育增大에 의하여 周邊으로 밀쳐져 간간것은 細胞質과의 境界가 不分明하여 뚜렷한 halo를 形成하지 않으므로 封入體로 認定하기 어려운 것도 있었다. 이런 것에서는 autoradiography를 施行한 標本에서 封入體와 一致하여 銀粒子가 發現되므로서 비로서 確認되는 수가 있었다.

Cowpox virus-FL 細胞系에 있어서의 AB兩型 封入體의 經時的 發現過程을 模式的으로 나타내면 Fig. 4에서와 같다. 이 經過로 미루어 우선 B型 封入體가 發現되어 그 內部에 成熟過程이 進行되기 始作하면 多分히 B型으로부터 細胞質로 遊離된 virus 粒子和 關聯하여 細胞質內에 A型 封入體가 形成되기 始作하는 것으로 보인다. A型 封入體 形成部位는 一定치 않은 것으로 B型과 無關한 部位에 있는 수도 있고 B型の 內部 또는 隣接한 部位에 形成되는 수도 있었다. B型 封入

體의 數가 感染 virus 粒子數에 對應하는 것으로 생각되는데 反하여 1個 細胞囊에 發生하는 A型 封入體의 數는 一定치 않은 것으로, 많을 경우에는 數 10個에 達하는 것이다. 事實 A型 封入體는 自己增大와 더불어 隣接한 A型과 相互 融合을 反復하면서 增大되어 갔다. 마침내 感染細胞는 核을 除外하고는 數 많은 A型 封入體로 占有되며 結局은 變性崩壞되어 갔다.

DNA 含有 如否를 밝히기 위한 Feulgen 反應, 結果, 細胞質內의 B型 封入體는 感染初, 末期를 不問하고 恒常 陽性反應으로 DNA 含有를 明白히 밝혀주었으나, A型 封入體는 恒常 陰性이었다.

封入體形成과 DNA 代謝(Autoradiography): 3H-thymidine을 使用한 定性的 autoradiography에 의해서 cowpox virus 感染 FL 細胞에서의 封入體 發現과 그 役割을 細胞質內 및 核內 DNA 合成의 觀點에서 究明하였다. 즉 感染細胞(m.o.i=1程度)를 3H-thymidine 含有培養液에서 培養하고 dipping 法으로 感光乳劑를 입힌다음 3~5日間 露出시켜 現象하므로서 黑化銀粒子를 發現시키고 다시 Giemsa 染色으로 後染色하여 觀察하였던바 細胞質內의 銀粒子는 例外없이 B型 封入體와 一致하여 標識되어 있음을 確認하였으나 A型 封入體에서는 全然 銀粒子를 찾아 볼 수 없었다(Fig. 5~6). 다만 B型 封入體라 하더라도 末期의 diffuse한 것에서는 銀粒子 確認이 어려웠다. 正常細胞와 感染細胞에서의 封入體를 含有치 않은 細胞의 核에서도 銀粒子의 發現을 볼 수 있으나 一般的으로 封入體에서 처럼 濃厚하지 않았다. 따라서 封入體를 構成하는 DNA가 virus 感染後에 새로이 形成되는 것을 示顯하는 것이며, A型 封入體만이 細胞質內의 DNA 合成部位임을 알 수 있었다.

이와같은 封入體에서의 銀粒子의 濃厚한 蓄積은 virus DNA의 合成이 B型 封入體의 表面에서 가장 活動的으로 이루어진다는 것을 推定케 하였으며, 感染細胞가 宿主細胞核에서의 DNA 合成과는 獨立的으로 細胞質內에서 DNA 合成을 이룬다는 것을 밝혀준 것이다.

細胞核에서의 DNA 合成과 細胞質內 B型 封入體에서의 그것과의 相互關係를 살펴보면, 正常細胞 또는 非感染細胞에서는 相當數의 核이 DNA를 合成하나 感染細胞는 核 DNA 合成의 有無에 不拘하고 細胞質內 DNA(封入體)合成이 行해지고 있으며, 더욱히 感染이 進行됨에 따라 封入體를 지니는 細胞는 모두 宿主細胞核 DNA 合成이 顯著하게 抑壓되는 것으로 보였다. 이와같은 事實은 細胞質內 DNA 合成은 宿主細胞核 DNA 合成의 進行如否에 關係없이 全型 別途로 發現된다는

것과 아울러 封入體 DNA 가 결코 細胞核에 一旦 生成 後 細胞質속으로 移動流出한 것이 아님을 示顯해 주 는 것임을 알았다.

**免疫螢光법에 의한 封入體와 抗原과의 關係**: 抗 cowpox virus 家兔血清 globulin 에 結合시킨 螢光抗體를 使用하여 直接法으로 反應시킨 感染細胞에서 黃綠色의 螢光部位는, 低倍率의 것에서 focus 樣 CPE 部位에 一致하여 發現되었으며(Fig. 7). 高倍率의 것에서는 B型 封入體部位에 合致되어 顆粒狀 또는 集塊狀으로 發現 되는 것을 觀察하였으나 圓形的 A型 封入體는 그 內部에서 螢光을 볼 수 없고 다만 周緣에서 강한 螢光을 發現하는 것을 觀察할 수 있었다(Fig. 8). 封入體의 螢光部位는 그 光輝特性때문에 實際보다도 더 擴大되어 보 이는 것이며, 이 周緣의 螢光部位 즉 擴原이 A型 封入體 基質의 一部인지 또는 周緣의 細胞質內의 B型 封入體의 것이 A型 封入體의 發展增大에 의해서 밀려나 濃縮된 것인지는 不分明하였다.

따라서 강한 螢光을 發現하는 B型 封入體는 virus 粒子를 構成하는 核蛋白(NP)抗原의 局在部位임을 알 수 있었다. 感染細胞의 核 및 A型 封入體 基質內에서는 거의 感染의 全經過를 通하여, 그리고 對照標本에 서도 全然 螢光을 確認할 수 없었다.

**漿液膜에서의 pock 形成 確認**: Cowpox virus LB red 株를 接種한 發育鷄卵의 CAM 上에는 接種後 4~5일에 多數의 pock 中心部로부터 出血을 이룬 red pock 의 形成을 觀察하므로써 使用 virus 株의 正確性を 再確認케 하여 주었다(Fig. 9).

## 考 察

**FL 細胞에 發現되는 封入體의 形態와 意義**: 近來 組織培養術法의 進展에 따라 從來 生體細胞內에서만 確認되었던 virus 에 의한 封入形成이 그대로 組織培養細胞에서도 再現될 수 있다는 것이 알려져, 封入體의 研究는 극히 容易하게 되었다. 同時에 여러 種類의 poxvirus 가 各種의 株化細胞에 대하여 特色있는 細胞變性을 나타낸다는 것도 밝혀졌다<sup>13)</sup>. 이들 株化細胞系에 있어서의 特色있는 CPE 發現은 各 poxvirus 에 있어 比較的 安定한 것이며 遺傳的 指標로서도 有用한 것으로 考慮되고 있다.

Kato<sup>20)</sup>, Hagiwara<sup>21)</sup>, Kato 및 Cutting<sup>11)</sup>, Kato 등<sup>15-17)</sup>은 各種 poxvirus 는 感染細胞에서 그 形態 및 染色上 同一性狀을 갖는 B型의 封入體와 몇몇 poxvirus 에서는 이것외에 2次的으로 全然 別個의 形態學的性狀을 갖는 A型 封入體를 形成한다는 것을 밝혔다. 또한

cowpox virus 를 包含한 몇몇 poxvirus 의 封入體에 대한 核酸의 組織化學的 研究에서 Kato 및 Kamahora<sup>13)</sup>는 A型 封入體가 Feulgen 反應 陰性이며 methyl green-pyronin 染色, acridine orange 染色에도 不染色인 것으로 DNA, RNA 를 모두 含有치 않은것을 나타내 주었으나 B型 封入體에 관한 한 Feulgen 反應 陽性이며 위의 各種 染色反應에서 methyl green 色素 및 黃綠色의 螢光을 發現하므로써 DNA 의 存在를 나타내 주었다고 報告한바 있다.

本實驗에서의 感染細胞의 Giemsa 및 H & E 染色에 의한 封入體의 發展過程과 上記他研究者들의 組織化學的 研究를 綜合하여 檢討하면, poxvirus 에 共通하는 것으로 推定되는 B型 封入體야말로 virus 의 素材인 DNA 및 蛋白質의 pool 이라는 것이 分明하며, 한편 A型 封入體는 그 出現이 一定치 않거나 늦으며 그 基質에서 核酸이 證明되지 못하고 粘稠切質의 어떤 物質로 이루어져 있는 것을 알 수 있다. 따라서 A型 封入體는 virus 增殖에 直接的으로 寄與하지 않는 2次的 產物이라는 것이 推定된다.

그러나 cowpox virus A型 封入體는 Kato 등<sup>14)</sup>이 報告한 微小基本小體로 充滿된 ectromelia virus (G strain)의 그것과는 多少相異한 것으로 보인다.

本實驗 結果 感染細胞에서의 兩型 封入體의 識別에는 methanol 固定, Giemsa 染色法과 Bouin 液固定, H & E 師色法을 併用하는 것이 좋은 方法으로 믿어졌으며, 더욱이 後者の 方法은 封入體 周圍에 halo 를 形成케 하므로써 優秀한 것으로 보였다. 이 halo 形成은 酸性液固定에 의한 封入體 內容物의 收縮때문인 것으로 推定된다.

**封入體形成과 DNA 代謝의 相互關係**: <sup>3</sup>H(三重水素)의 崩壞時에 放出되는 β線의 energy 는 極히 낮으므로 <sup>3</sup>H 를 利用하므로써 解像力이 높은 autoradiogram 을 얻게끔 되었다. <sup>3</sup>H 前驅物質에 의한 autoradiography 는 從來의 組織化學이 어느 物質의 存在를 나타내는 것에 反하여 細胞內에 있어서의 어떤 物質의 合成部位를 追跡할 수 있을 뿐만 아니라 合成量의 比較定量이 可能하다는 點에서 從來의 生化學的, 組織化學的 方法의 限界를 넘어서 훌륭한 方法이라고 할 수 있다.

本實驗에서의 定性的 autoradiography 에 의한 感染細胞의 封入體形成과 DNA 合成의 相關關係는 모든 B型 封入體에 一致하여 銀粒子가 發現되는 것에 反하여 A型 封入體에서는 全然 銀粒子의 發現을 確認할 수 없으므로써 B型만이 virus DNA 合成部位임이 自明하게 되는 것이다. 또한 autoradiography 法은 同一標本에

서 後染色을 兼하게 되는 것이므로 Giemsa 染色等 細胞化學的 單一方法에 의해서는 diffuse 한 封入體가 封入體로 認知되기에 애매한 경우에도 銀粒子的 發現으로 封入體임을 分明히 가려주는 것으로 매우 有用한 方法의 한가지로 確信되었다.

定量的 autoradiogram 으로 分析을 行한 加藤<sup>21)</sup>에 의하면, 感染時間의 經過와 더불어 細胞質에 標識되는 細胞數가 增加되고 反對로 細胞核이 標識되는 細胞數가 減少한다는 것이며, 또한 B型 封入體의 發展段階는 DNA 合成의 程度와 關係가 있는 것으로 5~10 μm 크기의 B型 封入體에서 가장 旺盛한 DNA 合成이 行해진다는 것이었다. 즉 그 程度는 正常細胞核 또는 同一標本囊의 封入體를 지니지 않은 細胞核에서의 DNA 合成에 匹敵할만한 것으로서 마치 細胞質內에 새로운 核이 發生한것 처럼 virus DNA 合成이 效率의으로 行해지고 있는 것을 알수 있다는 것이다. 또한 그는 宿主細胞核 DNA 의 B型 封入體로의 移行如否를 밝히는 實驗을 行하여, B型 封入體 DNA 는 모두 새로히 感染細胞質에서 合成된 것으로, 宿主細胞의 既存核 DNA 는 조금도 含有하지 않으며 核 DNA 를 構成하는 thymine 이나 thymidine 이 B型 封入體 DNA 合成에 關與할 可能性은 거이 없다는 것을 밝혔다.

**感染細胞의 細胞免疫學的 解析:** 螢光色素結合의 抗體에 의한 抗原追跡의 試圖는 Coons<sup>22)</sup>에 의하여 確立되어 動物 virus 學의 領域에도 廣範하게 應用되어 왔다<sup>1, 26)</sup>. Poxvirus 感染細胞에 대해서는 Noyes<sup>20)</sup>가 vaccinia virus 로 實驗하여 螢光部位는 主로 細胞質內로 局限되나 核內에도 抗原이 있다는 것을 밝혔다. 그러나 細胞化學的인 染色所見과의 比較가 없어 封入體와의 關係는 不明하였다. Takabashi 등<sup>21, 23)</sup>은 家兎粘液腫 virus 의 免疫家兎血清을 使用한 螢光抗體로 FL 細胞-virus 系를 使用하여 virus 의 感染價, 補體結合抗原價 및 封入體의 出現과 平行하여 螢光含有細胞의 追跡 實驗을 行하였다. 그 結果 virus 의 感染價, 補體結合抗原價의 上昇은 封入體含有細胞 및 螢光細胞와 密接한 關聯이 있다는 것을 밝혔다. 즉 黃綠色의 강한 螢光部位는 恒常 細胞質內에 局限되어 있었으며 同一標本の 그 部位를 mark 하여 다시 Giemsa 後染色으로 觀察하므로써 강한 螢光部位는 例外없이 모두 B型 封入體에 一致하는 것이 確認되었다는 것이다. 또한 같은 試圖가 家兎粘液腫, Shope 纖維腫, ectromelia 및 cowpox virus (LB white 株)-FL 細胞系 또는 Ehrlich 腹水腫瘍細胞系에서 應用되었던바 모두 강한 螢光部位는 B型 封入體에만 一致하여 確認되었다는 것이다<sup>13)</sup>.

이와 같이 同一標本에서 螢光抗體法과 細胞化學的 後染色 특히 autoradiography 後 染色法을 併用하여 解析하는 것은 virus 合成 및 封入體形成 또는 virus 感染에 基因하는 細胞의 惡性化的 解明에 極히 有用할 것이나 그 操作은 至極한 忍耐와 技巧을 要하는 것이다. 따라서 本實驗의 cowpox virus-FL 細胞系에서는 感染經過의 始終을 通하여 細胞核에서는 全然 螢光을 確認할수 없고, 兩型의 封入體 특히 A型의 圓形形態가 周緣의 螢光發現만으로도 뚜렷하므로 굳이 同一標本을 使用한 螢光抗體法 또는 autoradiography 와 後染色法의 併用 方法을 採擇할 必要를 느끼지 않았다.

다른 몇몇 poxvirus 에서의 螢光抗體法의 應用에서는 모두 B型 封入體에 一致하여 강한 螢光의 發現이 確認되었으나 A型 封入體에서는 感染의 全經過를 通하여 全然 螢光을 確認할 수 없었다는 報告<sup>9, 12, 17, 22)</sup>도 本實驗의 cowpoxvirus 의 경우와는 若干 相異하다는 것을 알았다.

細胞化學的 方法이 겹드려진 autoradiography 및 螢光抗體法을 應用한 本實驗의 cowpoxvirus-FL 細胞系의 病理形態學的 現象의 解析에 있어, B型 封入體는 DNA 뿐만 아니라 virus 抗原蛋白의 集積部位라는 事實이 밝혀졌으며 또한 全感染經過를 通하여 細胞核에서 螢光을 確認할 수 없는 것은 이 virus 의 蛋白合成이 細胞質內의 B型 封入體에 一致하여 이루어진다는 것을 示顯하는 것이라고 推定하였다. 한편 A型 封入體는 그 基質에 關한限 核酸 및 蛋白과는 無關係한 存在라는 것도 알 수 있었다.

**發育鰐卵 漿尿膜에서의 Pock 의 再現:** 元來 發育鰐 CMA 에서의 pock 形成法은 poxvirus 나 herpesvirus 와 같이 pock 를 形成하는 virus 에 限定하여, 純粹 clone 分離를 위한 plaque 法 代身 利用하거나 pock counting 法으로 使用 virus 株의 titration 에 利用하며 또한 virus 株의 pock 性狀에 따른 遺傳指標로 삼는데 利用되는 것이다<sup>21)</sup>.

Cowpox virus 株에는 LB red 및 white 의 모 strain 이 있는 것으로, 本實驗에서는 red strain 을 使用하였기 때문에 單純히 CAM 에서의 pock 形成에 있어 中心部의 出血에 의한 red pock 를 觀實하므로써 本 virus 株가 正確한 것임을 再確認하였을 따름이다.

本實驗에서의 感染細胞의 電子顯微鏡的 觀察을 위한 過程은 이미 包埋標本作成까지 完了되어 있으나 超薄切片標本の 作成과 觀察이 이루어지지 못하였으므로 此後에 報告하고자 한다.

## 結 論

Poxvirus 群은 典型的 細胞質內 封入體形成 virus 의 한가지로 考慮되어 왔으며, 모든 poxvirus 들이 感染組織內에서 한 種類의 封入體를 形成하는 것으로 報告되었으나 그 形成의 意義가 病理形態學的 現象의 解析으로 끝쳤고 virus 增殖과의 關聯에서의 檢討까지 伸張되지 못하였다. 近來 몇몇 種類의 poxvirus 에서는 2種類의 封入體形成이 밝혀져 그들이 virus 增殖의 相關關係에서 分析되고 있다.

本實驗에서는 病理形態學的 및 virus 學的 觀點에서 몇몇 group 別 poxvirus 들의 宿主-virus 間의 相互關係를 比較檢討하기 위한 model 로서 cowpox virus-FL 細胞系를 擇하여 試驗하므로써 다음과 같은 成績을 얻었다.

1. 感染細胞에서 初期段階에는 focus 樣 CPE 를 發現하나 感染經過에 따라 全面的인 CPE 로 進展되었으며 그 發現速度는 接種 virus 量에도 相關되었다.

Giemsa, H & E 및 MGG 染色으로 處理된 感染細胞의 細胞質內에는 2種類의 封入體가 形成되는 것으로, 于先의으로 B型 封入體가 發現되고 續發的으로 A型 封入體가 發現되었다. B型 封入體는 感染初期段階에서 compact 하게 形成되나 感染進展 後期에는 細胞質內에 diffuse 하게 廣散되어갔고 A型은 明確한 圓形狀으로서 그 크기와 數는 感染經過와 더불어 漸次 增大되어 갔다. 酸性固定, H & E 染色標本에서는 兩型 封入體周圍에 明確한 halo 서 形成하므로써 (末期에 이르러 B型은 若干 不明確) 더욱 識別이 容易하였다.

Feulgen 反應에 있어 B型 封入體는 始終 陽性反應을 나타내므로써 DNA 含有를 밝혀 주었으나 A型 封

入體는 陰性이었다.

2. <sup>3</sup>H-thymidine 을 使用한 定性的 autoradiography 에 의하여 感染細胞의 封入體形成과 DNA 代謝의 相關關係를 追跡한 結果, 모든 B型 封入體에만 一致하여 黑化銀粒자의 發現이 있었고 A型 封入體에서는 全然 銀粒存標識를 確認할 수 없으므로써, 封入體를 構成하는 DNA 가 virus 感染後에 새로히 形成되는 것이며 B型封入體만이 細胞質內의 DNA 合成部位임을 알았다. 또한 感染細胞는 宿主細胞核 DNA 合成과는 獨立的으로 細胞質內에 virus DNA 合成이 進行됨을 確認하였고, 感染이 進展됨에 따라 封入體를 지니는 細胞는 모두 그 核 DNA 合成이 顯著하게 抑壓되는 것을 알았다.

3. 免疫螢光法에 의하여 封入體와 virus 抗原과의 關聯을 追跡하였던바, B型 封入體에 一致하여 螢光이 發現되었으며 圓形狀의 A型 封入體에서는 그 基質에서 全然 螢光을 볼 수 없고 다만 周緣에서 螢光을 볼 수 있었다. 細胞核에서도 全感染經過를 통하여 螢光을 確認할 수 없었다. 따라서 B型 封入體는 virus 蛋白 合成의 場, 즉 virus 粒子를 構成하는 核蛋白抗原의 局在 部位임을 立證되었다.

4. 本 virus 株는 發育鷄卵 CAM에서 出血에 의한 red pock 를 形成하므로써 그 特性을 再確認케 하여 주었다.

5. 以上 兩型 封入體의 性狀과 그들의 virus 增殖에 있어서의 役割을 追究하므로써, B型 封入體는 virus DNA 및 蛋白의 合成部位임과 同時에 virus 增殖의 場임을 斷定케 하였다.

(本 研究의 大部分은 Colombo plan 에 의하여 著者が 5個月間(1972~73) 日本 大阪大學 微生物病研究所 滞在時 施行된것임).

## Legends for Figures

Fig. 1. A CPE area in a FL cell culture infected with cowpox virus, fixed with methanol, stained with Giemsa stain. Many scattered vacuole-like A type inclusions are seen in the area.

Fig. 2. Moderately developed B type inclusions (b) and many rounded A type inclusions (a) are observed in methanol fixed, Giemsa stained preparation. The B type inclusion stains reddish purple and the A type inclusion taking on pale blue tinge. n: nucleoli.

Fig. 3. Several compact B type inclusions. (b) taken on hematoxylin combined with eosin tinge and are surrounded by halos. Many moderately (a) developed A type inclusions (a) stain homogenous bright red and are also surrounded by halos. Fixed with Bouin's fluid, stained with H & E stain.

Fig. 4. Scheme of development of two different types of inclusions in cowpoxvirus infected FL cells. Giemsa stained (I) and H & E stained (II) preparations. Both types of inclusions are surrounded by halos in (II).

- Fig. 5. Autoradiogram of FL cells of the early stage of infection, exposed to 3H-thymidine, and restained with Giemsa stain. Note the intensive accumulation of silver grains corresponding to the compact B type inclusions (b). Many small and a few which are free from silver grains are also seen.
- Fig. 6. Autoradiogram of FL cells of the terminal stage of infection, restained with Giemsa stain. Note the many scattered silver grains corresponding to a diffuse B type inclusion (b), and many vacuole like medium and large A inclusions (a) which are free from silver grains.
- Fig. 7. Direct immunofluorescent staining of a FL culture infected with cowpox virus. Note the three fluorescent foci which are coincided with CPE areas.
- Fig. 8. The brilliant fluorescent spots are seen in the areas corresponding to the B type inclusions (b) in the cytoplasm of infected cells. Many round fluorescent localizations are also seen coincident with the edges of A type inclusions (a).
- Fig. 9. Virus pocks on CAM of a chicken embryo. Note the black spots (r) of the centers of pocks by hemorrhage (red pock).

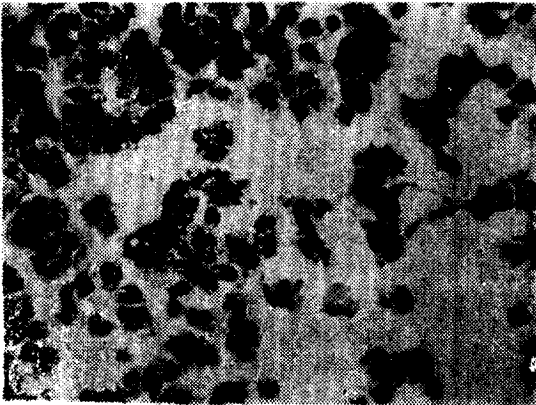


Fig. 1.



Fig. 2.

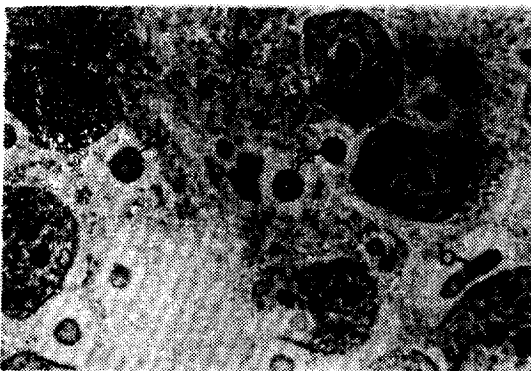


Fig. 3.

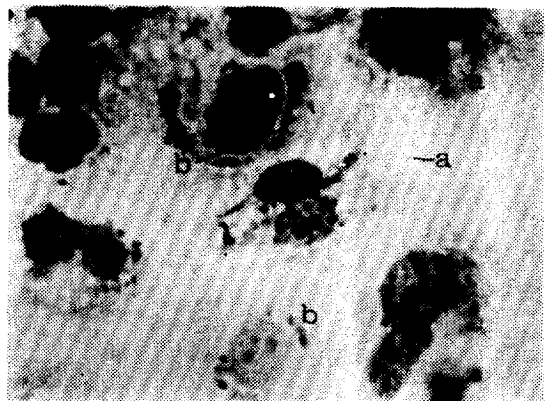


Fig. 5.



Fig. 6.

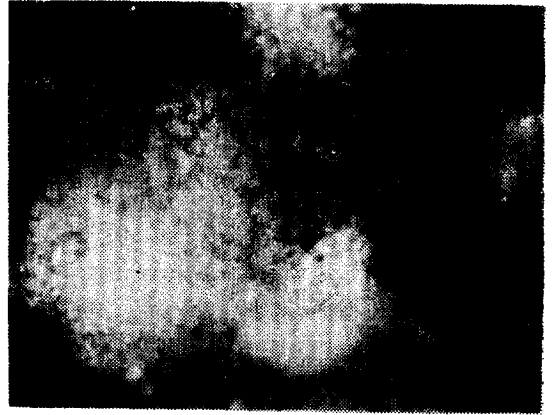


Fig. 7.



Fig. 8.



Fig. 9.

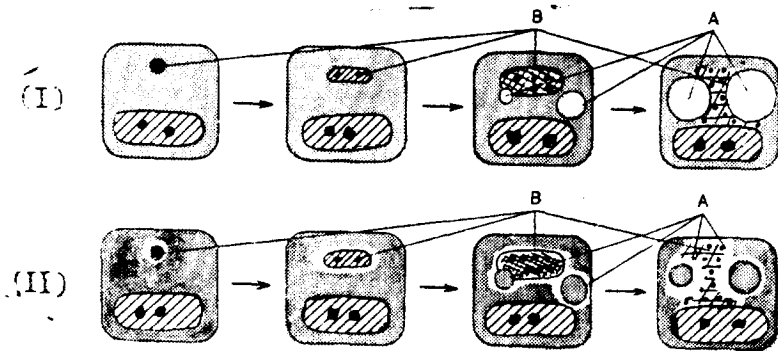


Fig. 4.



## 参 考 文 献

1. Beutner, E.M.: Immunofluorescent staining: the fluorescent antibody method. *Eact. Rev.* (1961) 25 : 49.
2. Bellinger, O.: Über Epithelioma contagiosum beim Haushuhn und die sogenannten pocken des Geflügels. *Arch. f. Path. Anat. Physiol.* (1873) 58 : 349. Cited by Chunningham (1965).
3. Cherry, W.B., Goldman, M. and Carski, T.R.: Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases. U.S. Govern. Print. Office. (1960) Publ. Health Serv. Publ. No. 729, p. 73.
4. Coons, A.H.: Labelling techniques in the diagnosis of viral diseases. *Bact. Rev.* (1964) 28 : 397.
5. Coons, A.H. and Kaplan, M.H.: Localization of antigen in tissue cells. *J. Exp. Med.* (1956) 91 : 1.
6. Gurnieri, G.: Ricerche sulla patogenesi ed etologica dell' infezione vaccinicae variolosa. *Arch. Sci. Med.* (1892) 16 : 403. Cited by Goodpasture (1928).
7. Hagiwara, K.: Studies on the growth cycle of ectromelia virus propagated in Ehrlich ascites tumor cells. *Virus* (1956) 6 : 23.
8. Hughs, W.L.: Autoradiography with tritium: the duplicating mechanism of chromosomes and the chronology of events related to nucleic acid synthesis. *Proc. 2nd UN Intl. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy* (1958) 25 : 203.
9. Kameyama, S., Takahashi, M., Toyoshima, K., Kato, S. and Kamahora, J.: Studies on the inclusion bodies of ectromelia virus using fluorescent antibody technique. *Biken's J.* (1959) 2 : 341.
10. Kato, S.: Studies on the inclusion bodies of ectromelia virus propagated in Ehrlich asciter tumor cells. *Virus* (1956) 6 : 23.
11. Kato, S. and Cutting, W.: Poxvirus inclusions in vitro and in vivo. *The 43rd Ann. Meet. Amer. Soc. Exp. Path., Philadelphia* (1958).
12. Kato, S. and Kamahohora, J.: Interaction between host cells and rabbit myxoma and Shope fibroma viruses. *Jap. J. Cancer Clinics* (1960) 6 : 418.
13. Kato, S. and Kamahora, J.: The significance of the inclusion formation of poxvirus group and herpes symposia *Cell. Chem.* (1962) 12 : 47.
14. Kato, S., Hagiwara, K. and Kamahora, J.: The mechanism of the growth of ectomelia virus propagated in the ascites tumor cells. I Study on the inclusion bodies of ectromelia virus. *Med. J. Osaka Univ.* (1955) 6 : 39.
15. Kato, S., Hagiwara, K., Baba, E., Sato, Y. and Kamahora, J.: Studies on the new inclusion bodies of fowlpox virus. *Virus* (1955) 5 : 318.
16. Kato, S., Takahashi, M., Kameyama, S. and Kamahora, J.: A study of new inclusion bodies of cowpox virus. *Biken's J.* (1959) 2 : 93.
17. Kato, S., Takahashi, M., Kameyama, S. and Kamahora, J.: A study on the morphological and cyto-immunological relationship between the inclusions of variola, cowpox, rabbitpox, vaccinia (variola origin) and vaccinia IHD and a consideration of the term "Guarnieri body". *Biken's J.* (1959) 2 : 353.
18. Kawanura, A. Jr.: Fluorescent antibody techniques and their applications. *Univ. Tokyo Press.* (1969).
19. Marchal, J.: Infectious ectromelia. A hitherto undescribed virus disease of mice. *J. Path. Bact.* (1930) 33 : 713.
20. Noyes, W.F.: A simple technique for demonstrating plaque formation with virus of vaccinia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* (1953) 83 : 426.
21. Takahashi, M., Kameyama, S., Kato, S., and Kamahora, J.: A study of myxoma virus inclusions by fluorescein-labeled antibody. *Biken's J.* (1958) 1 : 198.
22. Takahashi, M., Kameyama, S., Kato, S. and Kamahora, J.: The immunological relationship of the poxvirus group. *Biken's J.* (1956) 2 : 27.
23. Takahashi, M., Kato, S., Kameyama, S. and Kamahora, J.: A study on the multiplication of rabbitmyxoma virus with the fluorescent antibody technique. *Biken's J.* (1959) 2 : 333.
24. Thompson, S.W.: Selected histochemical and

- histopathological methods. C.C. Thomas Pub. Co., Springfield, Ill, (1966) p. 269.
25. Verley, W.G., Firket, H. and Hunebelle, G.: Preparations of tritium labeled thymidine and its use for study, by autoradiographic method, of the synthesis of deoxyribonucleic cells. Proc. 2nd Un Intl. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy. (1958) 25 : 181.
26. Wite, R.G.: Fluorescent antibody technique. In "Tools of Biological Research". H.J.B. Alkins ed. Vol. I, C.C. Thomas Pub. Co., Springfield, Ill. (1960) p. 89.
27. 加藤四郎: Poxvirus 感染の病理學—Autoradiographyによる細胞 levelの研究を中心として. 最新醫學 (1964) 19 : 567.
28. 加藤四郎: オートラジオグラフィ. 新ウイルス學 I. 東昇. 石田名香雄編集. 朝倉書店 (1972) p. 284.
29. 川村明義: 螢光抗體法. 新ウイマス學 I. 東昇. 石田名香雄編集. 朝倉書店 (1972) p. 145.
30. 川村明義: 螢光抗體法. 免疫の生化学「蛋白質核酸酵素」編集部編. 共立出版社 (1967) p. 284.
31. 植竹久雄: Virus 遺傳學. 新ウイマス學 I. 東昇. 石田名香雄編集. 朝倉書店 (1972) p. 130.

### Studies on Host-Virus Interaction of Poxviruses

#### 1. Cytochemical, Autoradiographic and Immunocytological Analysis in Cowpox Virus-FL Cell System

Uh Ho Kim, D.V.M., Ph.D.

*Department of Animal Science, Gangweon National College*

#### Abstract

The poxvirus group is considered to be a typical cytoplasmic inclusion forming virus. Every poxvirus has been reported to produce only one kind of inclusion in the infected tissues. A vague concept that inclusions of poxviruses are eosinophilic or acidophilic has prevailed. Although many papers and theories about the nature of the inclusion have been presented, most of them are not quite convincing on the point of the relations with virus multiplication, and an analysis of papers published showed that there seem to be many discrepancies in the descriptions of the nature of the poxvirus inclusions.

Comparative studies on host-virus interaction with cowpox, orf, swinepox and fowlpox viruses which selected from each Group (I-IV) of poxviruses were performed from the morphological and virological standpoints.

At first, in cowpox virus-FL cell system, as a comparative model, cytoplasmic inclusion, nucleic acid metabolism by autoradiography and detection of viral antigen by immunofluorescence were studied and obtained the results as follows:

1. The focus-like cytopathic effect (CPE) at early stage developed to entire culture at terminal stage of infection, and also the developing status of CPE was correlated to viral doses for inoculation.

Two kinds of cytoplasmic inclusions which named A and B type were easily observed by Giemsa, hematoxylin-eosin (H & E) and May-Greenwald Giemsa (MGG) stainings in the infected cells.

The B type inclusions were formed at early stage of infection and the A type inclusions were produced subsequently the B type formation. The B type which common type inclusion in pox-

viruses was a small compact or aggregate at early stage and developed to a large diffuse body at terminal stage of infection. On the other hand, the A type inclusion which depend upon the kind of virus was appeared as round and discrete shape, and its size and number was increased gradually during the culture period. It was characteristic to form distinct halos around the both types of inclusions in acid fixed, H & E stained preparations of infected cultures.

The B type inclusion was always positive in Feulgen reaction and showed as DNA containing body but the A type inclusion was not.

2. In the relationship between inclusion and DNA metabolism of infected cells by the qualitative autoradiography using <sup>3</sup>H-thymidine, the appearance of silver grains was coincided with B type inclusion but not with A type inclusion. This showed that the DNA synthesis was proceeded in all B type inclusions except those in the terminal stage with a diffuse form. This suggested that the B type inclusions are only sites of DNA synthesis and this was proceeded after the cell infection independently.

The activity of DNA synthesis of the inclusions was nearly the same as that of the nucleic of normal cells and non-inclusion bearing cells. and non-inclusion bearing cells. Regardless of the size of the degree of DNA synthesis of the B type inclusion, inclusion bearing cells all showed remarkable suppression of nuclear DNA synthesis.

3. By the direct fluorescent antibody technique viral antigen in infected cells was detected. The B type inclusions have been proved to contain a great deal of viral antigen, whereas the basic substance of A type inclusion did not show antigenicity except the round edge. It was suggested that the round edge fluorescence might be caused by the glare of cytoplasmic viral antigen which pushed out and concentrated by the A type inclusion development.

4. Hemorrhagic red pock formations on chorioallantoic membrane of embryonated chicken egg had proved the characteristic of used viral strain.

5. By the above studies on the nature of two types of inclusions and the role they play in virus multiplication, it was concluded that the B type inclusion must be the site of the synthesis of viral DNA and protein as well as the site of the virus.